

学校编码: 10384

密级_____

学号: 24520111153339

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**Rbm24 在心肌细胞中的重要作用及相关信
号分子初筛**

**The important role of Rbm24 and preliminary screening of
related signaling molecules in cardiac cells**

黄越

指导教师姓名: 徐秀琴 教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩日期: 2014 年 5 月

2014 年 4 月

Rbm24 在心肌细胞中的重要作用及相关信号分子初筛

黄越

指导教师

徐秀琴
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

目的 研究 Rbm24 在心肌分化和心肌细胞中作用的分子机制, 寻找 Rbm24 的靶标 mRNA 及与其相互结合的蛋白, 揭示 Rbm24 在干细胞心肌分化过程中的作用, 为探讨 Rbm24 敲低而导致心肌收缩受损的心肌病的相关信号通路提供一定的研究依据, 并为心肌病的治疗提供一个重要的新靶点。

方法 首先, 通过 qRT-PCR 检测 Rbm24 在 ESC 分化过程的表达情况。同时, 采用 Western blot 免疫印迹分析结合细胞免疫荧光染色检测 Rbm24 在原代心肌细胞、H9C2 细胞系、C2C12 细胞系的表达情况。然后, 利用 RNA 干扰技术构建的 Rbm24 敲低细胞 siRNA-Rbm24, 分析 Rbm24 敲低对心肌结构蛋白的表达及心脏收缩的影响。最后, 利用基因克隆和脂质体转染技术构建稳定过表达 Rbm24-Flag 的心肌母细胞 H9C2-23, 采用 RNA 蛋白免疫沉淀芯片 (RIP-CHIP) 技术对 Rbm24 相结合的靶标 mRNA 进行系统地分析, 并结合 RIP-PCR 进行验证。同时, 采用蛋白免疫共沉淀 (CO-IP)-质谱分析技术对与 Rbm24 相互结合的蛋白进行系统地分析, 并通过基因克隆技术和 CO-IP 进行验证。

结果 在 ESC 分化成心肌细胞的第三天, Rbm24 开始表达, 心肌分化启动, Rbm24 的表达一直上调到第六天。在原代心肌细胞中, α -actinin 标记的心肌细胞均显示 Rbm24 表达阳性, 且在核质中均匀分布。在心肌母细胞 H9C2 中, Rbm24 在核质中均匀分布, 诱导 H9C2 分化后, Rbm24 蛋白表达量上调, 且细胞质中的蛋白表达量上调明显。在肌原细胞系 C2C12 中, Rbm24 不表达, 利用马血清诱导 C2C12 分化成肌细胞的过程中, Rbm24 表达量逐渐升高。这些数据表明 Rbm24 是早期心肌分化的标志物, 在心肌组织中特异性表达。在心肌细胞中, Rbm24 敲低将导致心肌结构蛋白 TNNT2、TPM、MYH6 (α -MHC) 和 ACTN2 的表达减少, 并且使得细胞内肌丝的形态变得不清晰, 细胞的自发性收缩也减少了。这些数据表明, Rbm24 在心肌功能的维持中有重要作用。RIP-CHIP 技术获得了与 Rbm24 相结合的靶标 mRNA, 并通过 RIP-PCR 验证 Rbm24 与 MYOG 和 Stat3 mRNA 相结合。CO-IP 结合质谱分析获得可能与 Rbm24 相互结合的蛋白, 并进一步通过基因克隆与 CO-IP 验证与 Rbm24 相互结合的蛋白。

结论 Rbm24 在 ESC 分化成心肌细胞及心肌组织中特异性表达, 表明 Rbm24 是早

期心肌分化的标志物，且在心肌细胞功能和心肌收缩力的维持中有重要作用，很可能作为临床心肌病的一个指征。Rbm24可能通过调节其下游的靶标mRNA以及与相关蛋白的相互作用，在心肌分化和心肌细胞功能中起重要作用。

关键词：Rbm24；心肌细胞；靶标 mRNA；蛋白相互作用

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: This project aims to investigate the molecular and biochemical mechanisms of Rbm24 in cardiac differentiation and cardiac myocytes. Through the way to find the target mRNA of Rbm24 and its binding proteins, we can reveal the role of Rbm24 in stem cells differentiation. Then we can reveal Rbm24 knockdown related signaling pathways resulting cardiomyopathy and further to provide a research basis and an important novel target for the treatment of cardiomyopathy.

Method: qRT-PCR was used to detect the expression of Rbm24 protein in the process of ESC differentiation. Meanwhile, we use Western blot and immunofluorescence staining to detect the expression of Rbm24 protein in primary cardiomyocytes, H9C2 and C2C12 cell line. To analyze the impact of Rbm24 knockdown on the expression of cardiac structural proteins and cardiac contraction, RNA interference technology are applied to build Rbm24 knockdown cells siRNA-Rbm24. A stable transfection Rbm24-Flag overexpressing oocytes H9C2-23 cell line was build by gene cloning and lipofectamine transfection technique. RIP-CHIP technology was adopted to provide systematic analysis of target mRNA of Rbm24 and the results were verified with RIP-PCR. Meanwhile, CO-IP technology and mass spectrometry were adopted to provide systematic analysis of binding proteins of Rbm24 and the results were verified with gene cloning and CO-IP.

Results: In the third day of ESC differentiated into cardiomyocytes, Rbm24 was barely detectable and cardiomyocytes differentiation starts. The expression of Rbm24 increases by day 6. Rbm24 showed positive expression in α -actinin-labeled primary cardiomyocytes and evenly distributed in the nucleus and cytoplasm. Also, Rbm24 uniformly distributed in the nucleus and cytoplasm in H9C2 cell line and its expression was up-regulated specifically the cytoplasmic protein after the induction of differentiation. Rbm24 didn't express in C2C12 myogenic cell line, and its expression was gradually increased after the induction of differentiation into myoblast which use

the horse serum. These data suggested that Rbm24 is an early marker of cardiac differentiation and a heart-enriched gene. On the one hand, knockdown of Rbm24 reduces expression of sarcomeric proteins such as TNNT2, TPM, MYH6 (α -MHC) and ACTN2. On the other hand, it leads to a pattern of intracellular filaments became less clear and Spontaneous contraction was reduced. These data indicate the important role of Rbm24 in maintaining cardiac function. RIP-CHIP technology obtained the target mRNA of Rbm24 and the results were verified that MYOG and Stat3 bind with Rbm24. CO-IP combined with mass spectrometry obtained the target binding proteins of Rbm24, and further verified through gene cloning and CO-IP.

Conclusion: Rbm24 protein is expressed in the process of ESC differentiation into cardiomyocytes and cardiac tissue. The data suggested that Rbm24 is an early marker of cardiac differentiation and have an important role in cardiac cells and maintenance of myocardial contractility, which is likely to be used as an indication of clinical cardiomyopathy. Rbm24 regulated cardiac differentiation and the function of cardiac cells through its target mRNA and the proteins interacted.

Keywords: Rbm24; cardiomyocyte; target mRNA; protein interaction

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	V
Table of Contents	IX
第一章 前 言	1
1.1 心肌分化的调控	3
1.1.1 转录因子.....	3
1.1.2 细胞因子.....	4
1.1.3 化学诱导剂.....	4
1.2 RNA 结合蛋白.....	5
1.2.1 RNA 结合蛋白的结构	5
1.2.2 RNA 结合蛋白的功能	6
1.2.3 RBPs 与心肌分化的关系	7
1.2.3.1 心脏管的形成.....	8
1.2.3.2 心肌分化和肌原纤维形成.....	8
1.2.3.3 心脏形态发生.....	10
1.2.3.4 出生后心脏的成熟.....	10
1.2.3.5 发育失调和疾病.....	11
1.3 Rbm24 基因	11
1.3.1 Rbm24 基因的结构.....	11
1.3.2 Rbm24 基因的功能.....	13
1.3.3 Rbm24 基因研究进展.....	14
1.3.3.1 Rbm24 与 p63.....	15
1.3.3.2 Rbm24 与 p21.....	15
1.3.3.3 Rbm24 与 MYOD.....	15

1.3.3.4 Rbm24 与 MYOG.....	16
第二章 材料与方法	17
2.1 实验材料	17
2.1.1 细胞株.....	17
2.1.2 新生小鼠.....	17
2.1.3 菌种和载体.....	17
2.1.4 PCR 引物	17
2.2 主要仪器与耗材	18
2.3 主要试剂	19
2.4 实验内容与方法	22
2.4.1 基因真核表达质粒的构建.....	22
2.4.1.1 总 RNA 提取	22
2.4.1.2 RNA 反转录合成 cDNA 模板.....	23
2.4.1.3 由 cDNA 为模板 PCR 扩增目的基因.....	23
2.4.1.4 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳	24
2.4.1.5 从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段.....	25
2.4.1.6 DNA 限制性内切酶酶切 DNA 片段和载体片段	25
2.4.1.7 从酶切反应液中回收 DNA.....	26
2.4.1.8 载体去磷酸化处理.....	27
2.4.1.9 DNA 片段和载体的连接.....	27
2.4.1.10 连接物转化.....	27
2.4.1.11 质粒 DNA 小量提取	28
2.4.2 原代心肌细胞制备.....	29
2.4.3 细胞培养.....	30
2.4.3.1 细胞复苏.....	30
2.4.3.2 细胞传代.....	31
2.4.3.3 细胞冻存.....	31
2.4.3.4 细胞计数.....	32
2.4.4 细胞转染.....	32

2.4.4.1	PEI 转染法.....	32
2.4.4.2	X-tremeGENE HP DNA 转染试剂转染法.....	33
2.4.5	提取细胞总蛋白.....	33
2.4.6	BCA 法检测蛋白浓度.....	34
2.4.7	Western Blot 免疫印迹分析.....	34
2.4.8	细胞免疫荧光染色.....	35
2.4.9	免疫共沉淀 CO-IP.....	36
2.4.10	银染.....	37
2.4.11	RIP-PCR.....	39
2.4.12	定量逆转录-聚合酶链反应 qRT-PCR.....	40
2.4.13	核质分离.....	40
2.4.14	统计学分析.....	41
第三章	结果与分析	42
3.1	Rbm24 在心肌组织的表达	42
3.1.1	Rbm24 在 ESC 分化中的表达	42
3.1.2	原代心肌细胞.....	43
3.1.2.1	原代心肌细胞制备.....	43
3.1.2.2	Rbm24 在原代心肌细胞的表达.....	44
3.1.3	Rbm24 在心肌母细胞 H9C2 的表达及核质分布	45
3.1.4	Rbm24 在 C2C12 细胞系的表达	47
3.2	Rbm24 在心肌细胞中的敲低分析.....	49
3.3	稳定过表达 Rbm24-Flag 细胞株的建立与鉴定	51
3.3.1	稳定过表达 Rbm24-Flag 细胞株的建立	51
3.3.2	免疫荧光观察重组质粒 Rbm24-Flag 在 H9C2 细胞中的定位.....	52
3.4	RIP-CHIP 筛选与 Rbm24 相结合的 mRNA.....	53
3.5	免疫共沉淀 CO-IP 筛选与 Rbm24 相结合的蛋白	69
3.5.1	CO-IP 样品质谱分析	70
3.5.2	pXJ40-Myc-Ybx1 表达质粒的构建	76
第四章	讨 论	78

第五章 结 论	82
参考文献	83
致 谢.....	96

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Regulation of cardiac differentiation	3
1.1.1 Transcription factors	3
1.1.2 Cytokine.....	4
1.1.3 Chemical inducers.....	4
1.2 RNA binding proteins	5
1.2.1 The structure of RBPs	5
1.2.2 The function of RBPs.....	6
1.2.3 RBPs and myocardial differentiation.....	7
1.2.3.1 Formation of the heart tube.....	8
1.2.3.2 Cardiomyocyte differentiation and myofibril development.....	8
1.2.3.3 Cardiac morphogenesis	10
1.2.3.4 Postnatal maturation of the heart	10
1.2.3.5 Developmental dysregulation and disease	11
1.3 Rbm24 gene	11
1.3.1 The structure of Rbm24	11
1.3.2 The function of Rbm24.....	13
1.3.3 The progress of Rbm24.....	14
1.3.3.1 Rbm24 and p63	15
1.3.3.2 Rbm24 and p21	15
1.3.3.3 Rbm24 and MYOD.....	15
1.3.3.4 Rbm24 and MYOG.....	16
Chapter 2 Materials and methods.....	17

2.1 Materials	17
2.1.1 Cell lines	17
2.1.2 Neonatal mice	17
2.1.3 Strain and vectors	17
2.1.4 PCR Primers.....	17
2.2 Experimental equipments	18
2.3 Experimental reagents.....	19
2.4 Methods.....	22
2.4.1 Construction of eukaryotic expression vector.....	22
2.4.1.1 Total RNA extraction	22
2.4.1.2 The synthesis of cDNA template	23
2.4.1.3 PCR for gene subcloning	23
2.4.1.4 Agarose gel electrophoresis of PCR products	24
2.4.1.5 DNA extraction from agarose gel	25
2.4.1.6 Restriction endonuclease digestion of DNA fragment and vector.....	25
2.4.1.7 DNA extraction from enzyme reaction solution	26
2.4.1.8 Vector dephosphorylation	26
2.4.1.9 The ligation of DNA fragment and the vector	27
2.4.1.10 Ligation transformation.....	27
2.4.1.11 Small-scale plasmid DNA extraction.....	28
2.4.2 Primary Cardiomyocyte Isolation	29
2.4.3 Cell culture.....	30
2.4.3.1 Cell recovery	30
2.4.3.2 Cell passage	30
2.4.3.3 Cell cryopreservation	31
2.4.3.4 Cell count	31
2.4.4 Cell transfection	32
2.4.4.1 PEI transfection.....	32
2.4.4.2 X-tremeGENE HP DNA transfection	32
2.4.5 Total protein extraction	33

2.4.6	BCA assay	33
2.4.7	Western Blot.....	34
2.4.8	Immunofluorescence staining	35
2.4.9	CO-Immunoprecipitation.....	36
2.4.10	Silver staining	37
2.4.11	RIP-PCR.....	38
2.4.12	qRT-PCR.....	40
2.4.13	Nucleus and cytoplasm separation.....	40
2.4.14	Statistic Assay	41
Chapter 3	Results.....	42
3.1	The expression of Rbm24	42
3.1.1	Rbm24 expression in ESC differentiation	42
3.1.2	Primary Cardiomyocyte	43
3.1.2.1	Primary Cardiomyocyte isolation	43
3.1.2.2	Rbm24 expression in primary Cardiomyocyte	44
3.1.3	Rbm24 expression in H9C2 and nuclear-cytoplasmic distribution ...	45
3.1.4	Rbm24 expression in C2C12	47
3.2	Analysis of Rbm24 knockdown in caridac cells	49
3.3	Construction and detection of stable Rbm24-Flag overexpression cell line	51
3.3.1	Construction of stable Rbm24-Flag overexpression cell line	51
3.3.2	Rbm24-Flag location in cell line H9C2	52
3.4	Identfication of Rbm24 target RNAs by RIP-CHIP	53
3.5	Identfication of Rbm24 interacting proteins by CO-IP.....	69
3.5.1	Mass spectrometry of CO-IP sample	70
3.5.2	The construction of plasmid pXJ40-Myc-Ybx1	76
Chapter 4	Discussion	79
Chapter 5	Conclusion	83

Reference.....	84
Acknowledgement.....	96

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库